

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 57076455  
PUBLICATION DATE : 13-05-82

APPLICATION DATE : 30-10-80  
APPLICATION NUMBER : 55151499

APPLICANT : IMAI KAZUHIRO;

INVENTOR : WATANABE YOSHIHIKO;

INT.CL. : G01N 33/68 G01N 33/52

TITLE : NOVEL METHOD FOR DETECTION AND DETERMINATION OF AMINO ACID AND/OR AMINE

3STRACT : PURPOSE: To detect and determine amino acids and/or amines with high sensitivity by adding a fluorescence emissive reagent NBD-F into the sample to be tested to cause the sample to react and measuring the fluorescence intensity of the deriv. produced at this time.

CONSTITUTION: A sample to be tested contg. amino acids and a 0.1M boric acid buffer contg. 0.1ml NBD-F ethanol soln. and 20% ethanol are sampled in a test tube and are mixed. This test tube is put in a thermostatic chamber controlled to  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , to cause the amino acids or amine and the fluorescence emissive reagent NBD-F to react. Upon completion of the reaction, the test tube is cooled with iced water, after which the fluorescence intensity is measured by using a fluorophotometer. Thereby, the usage of the reagent and the sample is reduced and reaction time and reaction temp. are reduced.

COPYRIGHT: (C)1982,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-76455

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/68  
33/52

識別記号

庁内整理番号  
6422-2G  
6422-2G

⑬ 公開 昭和57年(1982)5月13日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ アミノ酸及び / 又はアミンの新規検出・定量  
方法

⑯ 発明者 渡辺芳彦

草加市新栄町1000新栄団地3-  
5-501

⑰ 特 願 昭55-151499

⑰ 出 願 人 今井一洋

⑱ 出 願 昭55(1980)10月30日

東京都世田谷区代田6-15-18

⑲ 発明者 今井一洋

⑲ 代理人 安藤憲章

東京都世田谷区代田6-15-18

明 細 書

1. 発明の名称

アミノ酸及び / 又はアミンの新規検出・定量  
方法

2. 特許請求の範囲

- 1) アミノ酸及び / 又はアミンを含有する被験試料中に発光試薬 7-フルオロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールを添加し、アミノ酸及び / 又はアミンと該発光試薬とを反応させ生じる誘導体の発光強度を測定することを特徴とするアミノ酸及び / 又はアミンの検出・定量方法
- 2) アミノ酸を含有する被験試料中に発光試薬 7-フルオロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールを添加し、アミノ酸及び / 又はアミンと該発光試薬とを反応させ、更に少量の酸にて溶液のpHを下げた後発光強度を測定することを特徴とするアミノ酸及び / 又はアミンの検出・定量方法

3. 発明の詳細な説明

本発明はアミノ酸及び / 又はアミンの新規検出・定量方法、特に 7-フルオロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール (以下 NBD-F と称す) を発光試薬として用いるアミノ酸及び / 又はアミンの新規検出・定量方法に関する。

7-クロロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール (以下 NBD-Cl と称す) によるアミノ酸及びアミンの蛍光分析はビー・ビー・ゴッシュ; ホワイトハウス, エム・ダブリュー, バイオケミカルジャーナル 1968 年 108 巻 155~156 頁 (Ghosh, P. B.; Whitehouse, M. W., Biochem. J. 1968, 108, 155~156) 及びフェーガー, アール・エス; クチナ, シー・ビー; アブラハムソン, イー・ダブリュー, アナリティカル・バイオケミストリー 1973 年 53 巻 290~294 頁 (Fager, R. S.; Kutina, O. B.; Abrahamson, E. W., Anal. Biochem. 1973, 53, 290~294) により紹介された。

NBD-Cl はアミノ酸及びアミン、特に第二ア

ミノ酸 (secondary amino acids) に対し優れた試薬であり、高速液体クロマトグラフィーを利用したポストカラム法による生体内プロリン及びヒドロキシプロリンの定量法が実施されるに至っている。しかしながら、この NBD-O4 を用いる方法は過酷な反応条件が必要とされ、しかも第二アミノ酸の分析にしか適さないことから、生体内アミノ酸及びアミンの微量分析の為に未だ充分であるとは言えない。このような状況のもとで、従来からより高感度なアミノ酸及びアミンの分析用試薬の開発が望まれていた。

本発明者等は上記背景のもと、より高感度なアミノ酸及びアミンの分析用試薬開発の為、鋭意検討した結果、反応性に優れ、かつアミノ酸及びアミンを高感度に検出・定量できる発光試薬として NBD-F を見出し、これに基づき本発明を完成した。

すなわち、本発明は、アミノ酸及び/又はアミンを含有する被験試料中に発光試薬 NBD-F を添加し、アミノ酸及び/又はアミンと該発光

試薬とを反応させ生じる誘導体の発光強度を測定することとを特徴とするアミノ酸及び/又はアミンの新規検出・定量方法である。以下、本発明について具体的に説明する。

試料に対し添加する NBD-F は水に不溶性である為にエタノール、メタノール等の親水性溶媒に溶解使用し、添加量はアミン及びアミノ酸 1 モルに対し 1 モル以上、特に 5 ~ 20 モルが好ましい。良好な反応性を期待する為の好ましいその他の条件としては、pH がアルカリ性であること、好ましくは 7.5 以上、反応温度が 40℃ 以上、好ましくは 60 ~ 70℃、反応時間は 5 ~ 60 分間、好ましくは 5 ~ 10 分間である。反応系における pH 維持の為には硼酸緩衝液、磷酸緩衝液等の緩衝液を用いると好都合で、中でも 0.1 M ホウ酸緩衝液が最良である。

本願によるもう一つの発明は、アミノ酸を含有する被験試料中に発光試薬 NBD-F を添加し、アミノ酸及び/又はアミンと該発光試薬とを反応させた後、更に少量の酸にて溶液の pH を下げた

後発光強度を測定することとを特徴とするアミノ酸及び/又はアミンの検出・定量方法である。

すなわち、NBD-F を用いる前記第一の発明による方法はアミノ酸又はアミンの検出・定量に際し、その高反応性故に感度上昇があるものの、同時に若干の盲検値の上昇を伴う。この現象は NBD-F が試料中に存在する水あるいはアンモニア等と反応する為と考えられるが、このような盲検値の上昇は測定感度の低下につながる。そこで本発明者等は、この点についても検討し、この盲検値の上昇は NBD-F とアミノ酸あるいはアミンとの反応の後、少量の酸を添加し、pH を下げることで回避できることを見出したものである。

反応系に添加する酸の種類としては塩酸、硫酸等の鉱酸で良く、添加量は最終 pH として 0 ~ 4、特に 0.5 ~ 2.5 となる量が最適である。

本発明の方法は従来の NBD-O4 を用いる方法に比し第二アミノ酸の検出限界を大巾に低下させることが出来るばかりでなく、第一アミノ酸およびアミンの高感度検出・定量も可能とし、かつ試

薬及び試料の使用量を少くした反応時間、反応温度を軽減出来るという利点を有する。

以下に本発明の実施例を示す。

#### 実施例 1

20% エタノールを含有する 0.1 M 硼酸緩衝液を pH 7.5, 8.0, 8.5 の 3 種類調製する。

6 群の 10 ml 用共栓付試験管を用意し、夫々  
(1) 1 mM NBD-F エタノール溶液 0.1 ml、20% エタノールを含有する 0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 7.5) 2.8 ml 及び 0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml、(2) 1 mM NBD-F エタノール溶液 0.1 ml、20% エタノールを含有する 0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) 2.8 ml 及び 0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml、(3) 1 mM NBD-F エタノール溶液 0.1 ml、20% エタノールを含有する 0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 8.5) 2.8 ml 及び 0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml、(4) 1 mM NBD-O4 エタノール溶液 0.1 ml、20% エタノールを含有する 0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 7.5) 2.8 ml 及び 0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml、(5) 1 mM N

第 1 表

試 薬	pH	反応時間 (分)	相対発光強度
NBD-F	7.5	5	13.5
		10	33.0
		20	53.5
		30	66.0
	8.0	5	63.0
		10	93.5
		20	98.0
		30	98.0
	8.5	5	91.5
		10	99.5
		20	100.0
		30	83.0
NBD-O <sub>2</sub>	7.5	5	0.5
		10	1.0
		20	2.0
		30	3.0
	8.0	5	1.5
		10	3.0
		20	4.5
		30	6.5
	8.5	5	4.5
		10	6.5
		20	10.5
		30	14.0

NBD-O<sub>2</sub>エタノール溶液 0.1 ml、20%エタノールを含有する 0.1 M 碳酸緩衝液 (pH 8.0) 2.8 ml 及び 0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml、(6) 1 mM NBD-O<sub>2</sub>エタノール溶液 0.1 ml、20%エタノールを含有する 0.1 M 碳酸緩衝液 (pH 8.5) 2.8 ml 及び 0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml を採取、混合した。

これら 6 群の試験管を  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  に調整した恒温槽中で、5 分間、10 分間、20 分間及び 30 分間の 4 種類の反応を行い、反応終了後、各試験管を氷水にて冷却後発光強度計を用いて励起波長 470 nm、発光波長 550 nm で発光強度を測定し、次の結果を得た。

## 実施例 2

50%エタノールを含有する 0.1 M 碳酸緩衝液を pH 7.5、8.0、8.5 の 3 種類調製する。

10 ml 用共栓付試験管を 2 群 1 対とし、合計 6 群 3 対を用意する。各群試験管に 1 mM NBD-F エタノール水溶液 0.1 ml、0.1 mM L-プロリン水溶液 0.1 ml 及び上記碳酸緩衝液 2.8 ml を採り、2 群 1 対 3 種類 (pH 7.5、8.0、8.5) の混合液を調整する。これら混合液を  $70^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  に調整した恒温槽中で 5、10、20、30、60 及び 90 分間反応させる。反応終了後、各試験管を氷水にて冷却し、2 群 1 対の一方は実施例 1 と同様の測定条件で発光強度を測定した。他方は 3 N 塩酸 0.1 ml を添加してから発光強度計を用いて励起波長 470 nm、発光波長 530 nm で発光強度を測定した。

なお、上記実験と平行して各群 L-プロリン水溶液に代え、同量の水を用いて盲検を行った。結果を第 1 図及び第 2 図に示す。

## 実施例 3

次の 5 種類のアミノ酸水溶液及びアミン水溶液を調製した。

L-プロリン	10 $\mu\text{M}$
L-ヒドロキシプロリン	5 $\mu\text{M}$
L-ザルコシン	10 $\mu\text{M}$
L-シスチン	10 $\mu\text{M}$
ジメチルアミン	10 $\mu\text{M}$

これらの試料を適当に希釈し、実施例 2 中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加法と同様の方法に従い検出限界を求めた。結果を第 2 表に示す。なお、検出限界は盲検値の 2 倍に設定した。

第 2 表

	検出限界 (nmol)
L-プロリン	0.25
L-ヒドロキシプロリン	0.13
L-ザルコシン	0.5
L-シスチン	1.0
ジメチルアミン	2.0

## 4. 図面の簡単な説明

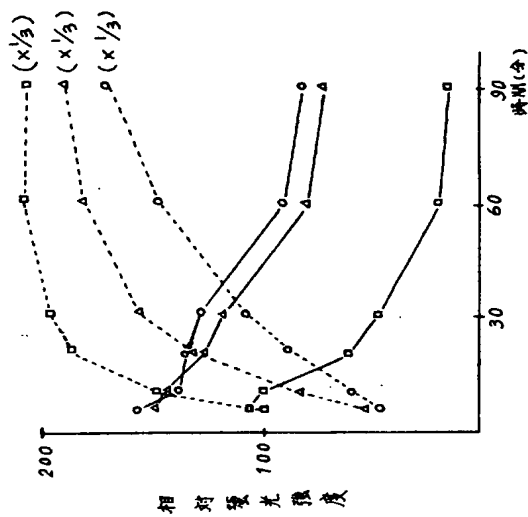
第一図は塩酸を添加しない場合の各群及びそれらの盲検の結果を、第二図は塩酸を添加した場合の各群及びそれらの盲検の結果を示す。なお第一及び第二図において—○—はpH 7.5、—△—はpH 8.0、—□—はpH 8.5の各群の結果を、……○……、……△……及び……□……はそれら盲検の結果(順序同)を示す。また、図中( $\times \frac{1}{3}$ )なる表示は数値がスケール・オーバーする為便宜上 $\frac{1}{3}$ の値で示したことを示す。

代理人 安 藤 憲 章



出願人 今 井 一 洋

図一



図二

